この添付文書をよく読んでから使用して下さい.

体外診断用医薬品

2006 年 2 月作成(第1版)

承認番号 21200AMZ00405000

カンジダキット
血清中のカンジダ抗原検出用

ユニメディ®「カンジダ」

[全般的な注意]

(1) 本キットは体外診断用であり, それ以外の目的に使用しないで下さい.
(2) 本キットで陰性と判定された場合でも, カンジダ抗原の存在を完全には否定できません. 測定結果に基づく臨床診断は, 臨床症状や他の検査結果等とあわせて担当医師が総合的に判断して下さい.
(3) 添付文書記載以外の使用方法については, 保証いたしません.
(4) 使用する機器の添付文書及び取扱説明書をよく読んでから使用して下さい.
(5) 本キットの検体処理液, 標識抗体液, 濃縮洗浄液, 陰性コントロール, 陽性コントロール 1, 陽性コントロール 2 には, アジ化ナトリウムが含まれていますので, 誤って目や口に入ったり, 皮膚に付着した場合には水で洗い流す等の応急処置を行い, 必要があれば医師の手当て等を受けて下さい.

[形状・構造等(キットの構成)]

	96 回分
(1) 検体処理液	30mL×1 ビン
(2) 標識抗体液 アルカリホスファターゼ標識ウサギ由来抗マンナンポリクローナル抗体	11mL×1 ビン
(3) 発色液 1	5mL×1 ビン
(4) 発色液 2 パラヨードニトロテトラゾリウムバイオレット エタノール	5mL×1 ビン
(5) 発色液 3 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸	5mL×1 ビン
(6) 反応停止液	15mL×1 ビン
(7) 濃縮洗浄液	20mL×1 ビン
(8) 陰性コントロール	8mL×1 ビン
(9) 陽性コントロール 1 マンナン 0.1U/mL	1mL×1 ビン
(10) 陽性コントロール 2 マンナン 1.0U/mL	1mL×1 ビン
(11) 抗体固定化プレート ウサギ由来抗マンナンポリクローナル抗体	1 袋

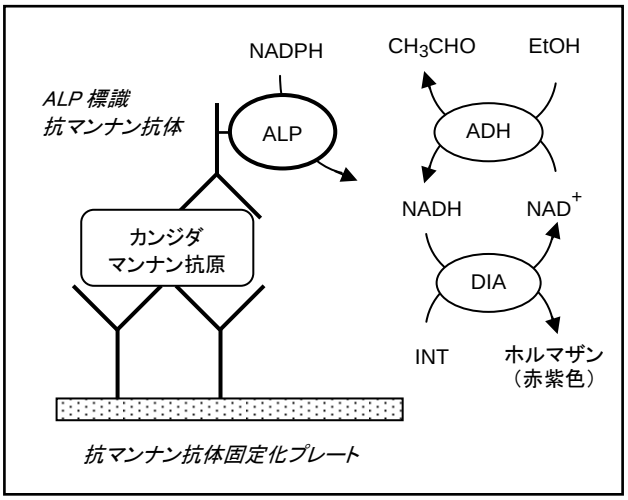
[使用目的]

血清中のカンジダ抗原検出

[測定原理]

本キットは, 2 ステップサンドイッチ ELISA 法により, 血清中のカンジダ抗原を検出するキットです. まず, 抗マンナン抗体を固相化したマイクロプレートに検体中のカンジダ抗原を反応させ, 次いでアルカリホスファターゼ(ALP)標識抗マンナン抗体を反応させ, 複合体を形成させます. この複合体の ALP 活性を酵素サイクリング増幅法を用いて測定します. すなわち, ALP の基質 NADPH を添加しますと NADH が生成します. 生成した NADH が発色剤パラヨードニトロテトラゾリウムバイオレット(INT)をジアホラーゼ(DIA)の作用により還元し, INT から赤紫色のホルマザンを生成させます.

一方, NADH は NAD^+ となりますが, アルコール脱水素酵素(ADH)およびエタノールにより還元され再び INT の還元反応に利用されます. このサイクルを繰り返すことでシグナルを増幅します. このようにして生成するホルマザン量は, 検体中のマンナン濃度の増加にともない増加します. 既知濃度のコントロール液と比較することで検体中のマンナンの有無を判定します.



[操作上の注意]

(1) 測定試料の性質・採取方法
  ① 検体は血清を使用して下さい.
  ② 検体採取後, 24 時間以内に測定する場合は, 2～8℃で保存して下さい. 採取後 24 時間以降に測定する場合は, −20℃以下で凍結保存して下さい.
  ③ 検体の凍結融解の繰り返しは避けて下さい.
(2) 妨害物質・妨害薬剤
  乳び(2860 ホルマジン濁度), ヘモグロビン(480mg/dL), ビリルビン(20mg/dL), リウマチ因子(116IU/mL)は( )内の濃度まで影響を受けません.
(3) その他
  ① 検体の加熱処理にヒートブロックを使用する場合は, 検体処理チューブ内の液体が 100～105℃, 4分間となるように設定して下さい. ヒートブロックでは, 設定温度よりもチューブ内温度は低くなる場合があり, また, 沸騰浴に比べるとチューブ内部の液体温度の上昇時間が長く必要です. 一般的な設定条件として, 設定温度 105℃, 15 分間が目安と

なりますが，装置により異なりますので各装置ごとに確認して下さい．加熱処理が不十分な場合は，測定に必要な上清の液量が得られないことや，測定結果が偽陰性になることがあります．

② 陰性，陽性コントロールは前処理不要です．

［用法・用量（操作法）］

(1) 試薬の調製法

① 洗浄液

濃縮洗浄液をメスシリンダーにとり，精製水で 40 倍にメスアップして下さい．測定後の余った液は廃棄して下さい．

② 抗体固定化プレート

袋のまま常温（22～28℃）に戻した後，測定に必要なウェル数を取り出し，プレートホルダーにきっちりとはめます．使用しないウェルは，乾燥剤とともに袋に戻し，封をして 2～8℃で保存し，2 週間以内に使用して下さい．

③ その他の試薬

検体処理液，標識抗体液，発色液1，発色液2，発色液3，反応停止液，陰性コントロール，陽性コントロール1，陽性コントロール 2 は常温に戻した後，そのまま使用して下さい．一旦ボトルから取り出した試薬溶液は，使用後戻さないで下さい．

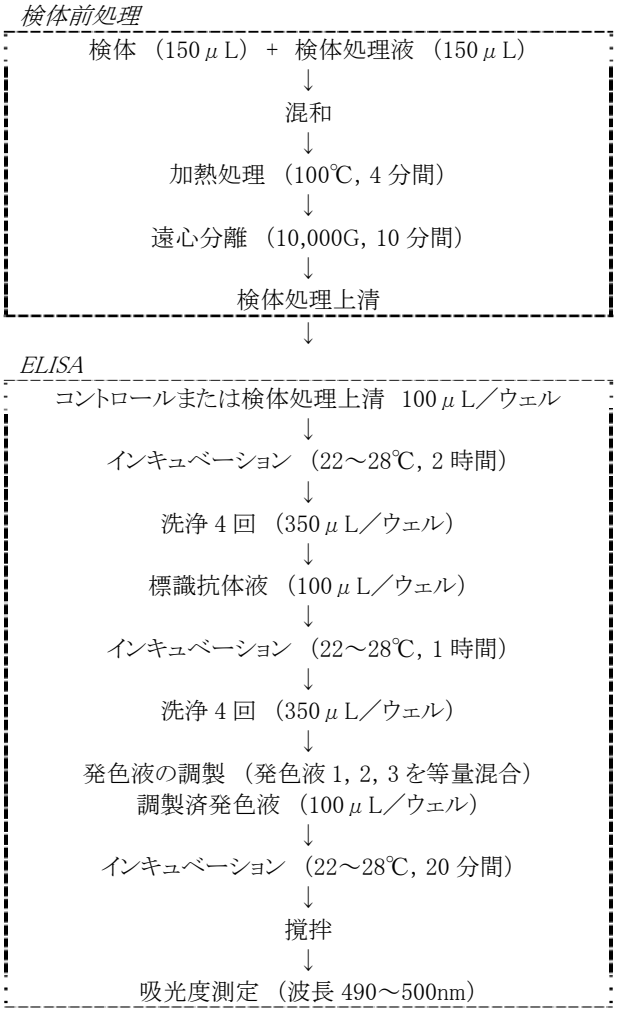
(2) 必要な器具・器材・試料など

① 検体処理用チューブ（フタ付，耐熱 120℃）
② ピペットマン（100～1000μL 用）とディスポーザブルチップ
③ プレート洗浄機
④ メスシリンダー（1L 用）
⑤ 湯浴（100℃）またはヒートブロック
⑥ 遠心分離機
⑦ プレートリーダー（フィルター490～500nm）
⑧ タイマー（1 秒単位で計測できるもの）
⑨ 発色液混合用の清浄な容器
⑩ 精製水（0.8L）

(3) 操作法

① 検体処理用チューブに検体と検体処理液を各 150μL 分注し，混合します．
② 沸騰浴（100℃）で 4 分間インキュベーションします．
③ 遠心分離（10,000G，10 分間）します．
④ プレートの各ウェルに検体処理後の上清または陰性，陽性コントロール1，陽性コントロール 2 を 100μL ずつ分注します．
⑤ 22～28℃で 2 時間インキュベーションします．
⑥ 各ウェルの反応液を吸引除去し，洗浄液を 350μL ずつ添加した後，吸引除去します．この操作を合計 4 回繰り返します．
⑦ 各ウェルに標識抗体液を 100μL ずつ分注します．
⑧ 22～28℃で 1 時間インキュベーションします．
⑨ 各ウェルの反応液を吸引除去し，洗浄液を 350μL ずつ添加した後，吸引除去します．この操作を合計 4 回繰り返します．
⑩ 清浄な容器を用いて，必要量の発色液 1，発色液 2，発色液 3 を等量ずつ混合し，発色液を調製します．この操作は，発色液の分注操作直前に行います．
⑪ 直ちに⑩で調製した発色液を各ウェルに 100μL ずつ分注します．
⑫ 22～28℃で正確に 20 分間インキュベーションします．
⑬ 反応停止液を各ウェルに 100μL ずつ分注し，プレートを撹拌します．
⑭ プレートリーダーで 490～500nm の吸光度を測定します．
⑮ 陰性コントロール，陽性コントロール 1，陽性コントロール 2 のマンナン抗原濃度を X 軸に，それぞれの吸光度を Y 軸にプロットし，検量線を作成し，検体の吸光度から検体中のマンナン濃度を算出します．

操作フロー



＊注 陰性，陽性コントロールは前処理せずに使用して下さい．

［測定結果の判定法］

(1) 判定方法

マンナン抗原濃度 0.05U/mL 未満の場合を陰性，マンナン抗原濃度 0.05U/mL 以上の場合を陽性と判定します．

(2) 判定上の注意

① 検体によっては，まれに検体中の目的成分以外との反応や妨害反応を生じることがあります．測定値や測定結果に疑問がある場合は，再検査や希釈再検査により確認して下さい．
② 診断・治療効果の判定は，本法を含めて関連する他の検査や臨床症状に基づき医師が総合的に判断して下さい．

[臨床的意義]

深在性カンジダ症は，易感染性患者に発症する日和見感染症の一つで，血液疾患，自己免疫疾患，AIDS など，宿主の免疫能の低下した疾患や広領域抗生剤，抗癌剤，副腎皮質ステロイド剤の投与などによる宿主の免疫能が低下しやすい治療，また，各種カテーテル留置による機械的バリヤの破綻により発症します．深在性カンジダ症では，その発症早期に的確な診断を下すことが，的確な治療のために重要と考えられており，通常，基礎疾患，臨床背景，臨床症状の観察，菌学的検査，病理組織学的検査，血清学的検査の結果などを総合的に判断して診断が行われています．血清学的検査の中では，カンジダの細胞壁の主要な構成成分の多糖体であるマンナン検出は，1970 年代より研究されており，深在性カンジダ症の補助的診断としての有用性が，Lewら[1]やLehmannら[2]，Nakamuraら[3]，Fujitaら[4]，谷口ら[5]より報告されています．マンナンは血中では，大部分が抗体などと結合して存在しており，この複合体を熱または化学処理により解離させて検出する必要があります．

ユニメディ「カンジダ」は，ウサギ由来抗マンナンポリクローナル抗体を用いたサンドイッチELISA法と酵素サイクリング増幅法を組み合わせ，カンジダマンナンを検出するキットです．ポリクローナル抗体を採用することで，幅広い菌種反応性を示します[6]．

[性能]

(1) 性能

① 感度試験

マンナン1.0U/mLとマンナン0U/mLを測定するとき，吸光度差は 0.3 以上です．

② 正確性試験

陰性コントロールを試料として測定するとき，陰性と判定されます．陽性管理血清を試料として測定するとき，陽性と判定されます．

③ 同時再現性試験

陰性コントロールを試料として5回測定するとき，全例陰性と判定されます．

陽性管理血清を試料として 5 回測定するとき，全例陽性と判定されます．

④ 最小検出感度

本キットの最小検出感度は，マンナン 0.05U/mL です[7]．

(2) 相関性試験成績

本キットとA社キットとの相関性について，109 例の検体を用いて検討した結果，陽性一致率 100%，陰性一致率 90.7%，全体一致率 91.7%となりました．不一致例については，全例で血液培養法によりカンジダ属菌種が分離されて，深在性カンジダ症と考えられました．

相関性

		A 社キット		
		陽性	陰性	合計
本キット	陽性	12	9	21
	陰性	0	88	88
	合計	12	97	109

陽性一致率 ： 100.0% (12/12)
陰性一致率 ： 90.7% (88/97)
全体一致率 ： 91.7% (100/109)

(3) 較正用の基準物質

谷口らの方法[5]に従って，*Candida albicans* YD1124 株死菌体を調製し，Reiss らの方法[8]に従いマンナン抗原を調製し，得られたマンナン抗原を重量法により値付けしたものを基準物質として用いています(1ng を 1U と表記)．

[使用上又は取扱い上の注意]

(1) 取扱い上(危険防止)の注意

① 検体はHIV，HBV，HCV等の感染のおそれがあるものとして取扱って下さい．

② 検査にあたっては，感染の危険を避けるため，使い捨て手袋を着用し，口でのピペッティングは行わないで下さい．

③ 本キットの発色液 3 には pH11 のアルカリが，また反応停止液には 1M リン酸が含まれています．酸，アルカリの取扱いにご注意下さい．

(2) 使用上の注意

① 本キットの操作は用法・用量欄に従って行って下さい．

② 本キットは貯蔵方法に従って保存し，ラベル記載の使用期限内に使用して下さい．

③ 保存および反応中は強い光をあてないようにして下さい．

④ 凍結させた試薬は使用しないで下さい．

⑤ 製造番号の異なる試薬を組み合わせて使用しないで下さい．

⑥ 標識抗体液は酵素標識抗体を含有しています．各発色液へのクロスコンタミネーションが起こらないように器具を分けて使用して下さい．

(3) 廃棄上の注意

① 検体中には HIV，HBV，HCV 等の感染性の恐れがあるものが存在する場合があるので，廃液，使用済みの器具などは，次亜塩素酸ナトリウム(有効塩素濃度 1%以上，1 時間以上浸漬)またはグルタルアルデヒド(2%以上，1時間以上浸漬)による滅菌処理あるいはオートクレーブ(121℃，20 分以上)処理を行って下さい．

② 本キットの下記の試薬には，アジ化ナトリウムが 0.05% 含有されています．廃棄の際には多量の水とともに流して下さい．

検体処理液，標識抗体液，濃縮洗浄液，
陰性コントロール，陽性コントロール 1，陽性コントロール 2

③ 試薬及び器具等を廃棄する場合には，廃棄物の処理及び清掃に関する法律，水質汚濁防止等の規定に従って処理して下さい．

[貯蔵方法・有効期間]

(1) 貯蔵方法　遮光・2～8℃

(2) 有効期間　12ヵ月 (外箱に使用期限を表示)

[包装単位]

96 回測定用

[主要文献]

(1) Lew MA, Siber GR, Donahue DM and Maiorca F : Enhanced Detection with an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of *Candida* Mannan in Antibody-Containing Serum after Heat

Extraction. J Infect Dis, 145 (1), 45-56, 1982
(2) Lehmann PF and Reiss E : Detection of *Candida albicans* by Immunodiffusion, Counterimmunoelectrophoresis and Enzyme-Linked Immunoassay. Mycopathologia, 70 (2), 83-88, 1980
(3) Nakamura A, Ishikawa N and Suzuki H : Diagnosis of Invasive Candidiasis by Detection of Mannan Antigen by Using the Avidin-Biotin Enzyme Immunoassay. J Clin Microbiol, 29 (11), 2363-2367, 1991
(4) Fujita S and Hashimoto T : Detection of Serum *Candida* Antigens by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and a Latex Agglutination Test with Anti-*Candida albicans* and Anti-*Candida krusei* Antibodies. J Clin Microbiol, 30 (12), 3132-3137, 1992.
(5) 谷口彰良, 保直行, 石川千恵子, 手計雅彦, 久米俊久, 荒木一, 出井敏雄, 久米光, 奥平雅彦:内臓カンジダ症における血清中カンジダマンナンのラテックス試薬による検出(第一報), 日本真菌学雑誌 32(3), 197-203, 1991.
(6) 吉田耕一郎, 二木芳人, 宮下修行, 松島敏春:ELISA を用いたカンジダマンナン抗原検出キットの臨床的有用性の検討. 感染症学雑誌 76:536-541, 2002.
(7) 新崎晃弘, 平野真弓, 渡辺光雄, 藤田信一:ELISA 法によるカンジダマンナン抗原の高感度検出法の基礎的検討. 機器・試薬 23:197-203, 2000.
(8) Reiss E, de Repentigny L, Kuykendall RJ, Carter AW, Galindo R, Auger P, Bragg SL, Kaufman L : Monoclonal Antibodies against *Candida tropicalis* Mannan: Antigen Detection by Enzyme Immunoassay and Immunofluorescence. J Clin Microbiol, 24 (5), 796-802, 1986.

[問い合わせ先]
極東製薬工業株式会社
〒103-0024 東京都中央区日本橋小舟町 7-8
電話 03-5645-5663(代)

販売元
極東製薬工業株式会社
〒103-0024 東京都中央区日本橋小舟町 7-8

製造販売元
ユニチカ株式会社
〒444-8511 愛知県岡崎市日名北町 4 番地 1
TEL 0564-22-8466